

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 05.09.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister inżynier Arniki Przybylskiej
„Mechanizmy obronne kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.) zainfekowanej
nicieniem *Meloidogyne arenaria*”**

Obecność i aktywność różnego rodzaju patogenów roślin stanowi od początku historii prowadzenia upraw przez człowieka zagrożenie dla jakości i wielkości zbiorów. Wśród szeregu organizmów patogennych (prokariotycznych i eukariotycznych) nicienie są ważną grupą zmniejszającą wysokość plonów. Wśród nich, rodzaj *Meloidogyne* czyli guzaki, jest rozpowszechniony wśród roślin w różnych strefach klimatycznych, a jego szeroki zakres gatunkowy gospodarzy sprawia, że w punkcie widzenia rolnictwa i upraw eksperymentalnych nicienie te stanowią bardzo istotną grupę patogenów, powodując uszkodzenia korzeni i zaburzenia wzrostu roślin. Spośród tego rodzaju, *Meloidogyne arenaria* odgrywa ważną rolę jako patogen roślin stref klimatu ciepłego, stwarzając zagrożenie dla upraw szklarniowych w Polsce, jednakże stopniowe znaczące ocieplanie klimatu powoduje przesuwanie się zasięgu tych patogenów na północ, co sprawia, że mogą one pojawiać się coraz częściej wśród typowych upraw polowych. Szeroki zakres gospodarzy sprawia, że nicien ten może być poważnym zagrożeniem upraw, atakując zarówno rośliny jedno- jak i dwuliścienne. O ile wiedza na temat oddziaływań nicieni-gospodarz jest dość obszerna w odniesieniu do roślin dwuliściennych, to na temat mechanizmów obronnych roślin jednoliściennych przed atakiem *Meloidogyne* wiedza jest mocno ograniczona, a badania prowadzono dotychczas głównie na modelu ryżu. Dlatego, podjęcie przez Doktorantkę, Panią mgr inż. Arnikę Przybylską, tematyki

oddziaływań nicienia *M. arenaria* na innego modelowego przedstawiciela *Monocotyledones*, jakim jest kukurydza *Zea mays*, uważam za bardzo uzasadniony zarówno dla rozwoju wiedzy podstawowej o mechanizmach obronnych roślin jak i dla przyszłego opracowywania możliwości zapobiegania infekcjom przez pasożyty. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Przybylskiej została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu, pod opieką Pani Promotor, dr hab. Aleksandry Obrępańskiej-Stęplowskiej, prof. IOR-PIB. Zespół Pani Profesor od lat zajmuje się zagadnieniami związanymi z molekularnymi mechanizmami interakcji między rośliną a różnego rodzaju patogenami oraz rozwojem odporności roślin na patogeny. Dzięki temu Doktorantka mogła w pełni skorzystać z bardzo bogatego doświadczenia i zaplecza wiedzy i metodologii zespołu Pani Profesor, co zaowocowało bardzo dobrą pracą doktorską.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Arniki Przybylskiej ma postać zbioru wieloautorskich publikacji: jednej przeglądowej, trzech publikacji oryginalnych i manuskryptu, który ukazał się na platformie preprintowej BioRxiv. Prace te (poza preprintem) ukazały się w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach z dziedziny, takich jak *Plant and Soil*, *Physiological and Molecular Plant Pathology* i *Molecular Biology Reports*. Jednakże, załączony w rozprawie jako 5 pozycja pre-print z BioRxiv nie może zostać uznany jako równocenny pozostałym pracom. Z uwagi na to, że przewód doktorski Pani mgr Przybylskiej został otwarty w tzw. starym trybie, preprint nie spełnia wymogów ustawowych (gdzie zostało wyszczególnione, iż wszystkie artykuły muszą być opublikowane w czasopismach z listy MEiN). Niemniej jednak pozostałe 4 prac są wystarczające cennym dorobkiem naukowym, aby rozprawa została oceniona pozytywnie. W rozprawie dołączone zostało streszczenie w języku polskim i angielskim i bardzo ciekawe omówienie uzyskanych wyników wraz z podsumowaniem. Taka forma rozprawy doktorskiej, w postaci zbioru prac łączonych jedną linią tematyczną, jest zgodna z wymogami zawartymi w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki. Jest tam określone, że rozprawa doktorska może stanowić wyodrębnioną część prac zbiorowych o ile został odpowiednio wykazany wkład kandydata w powstanie prac, co dotyczy zarówno części koncepcyjnej i założeń pracy, jak i uzyskania wyników, ich opracowania, przedstawienia i przedyskutowania. Do oceny wkładu doktoranta służą odpowiednie oświadczenia samego kandydata oraz współautorów prac. W przedstawionej rozprawie zawarto właściwe oświadczenia, ponadto, w kilku z prezentowanych prac znajduje się punkt Authors Contribution określający szczegółowo rolę każdego ze współautorów w powstanie pracy. Należy podkreślić,

iż Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich załączonych pracach. To, wraz z oświadczeniami wskazuje jednoznacznie na kluczową rolę, jaką Pani Przybylska pełniła w czasie pracy nad tymi publikacjami. Rola ta polegała między innymi na opracowaniu hipotez badawczych, planowaniu eksperymentów, opracowywaniu danych, przygotowaniu i redagowaniu manuskryptu. Na podstawie przedstawionej dokumentacji można bez wątpienia stwierdzić, że wymogi formalne stawiane pracom doktorskim prezentowanym jako cykl publikacji zostały spełnione. Warto tu podkreślić, że o znaczeniu prezentowanych wyników świadczy fakt, że przeszły już one etap oceny recenzenckiej, która jak wiadomo jest dokładna i skrupulatna.

Celem badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Arniki Przybylskiej było poznanie mechanizmów molekularnych procesów indukowanych w roślinie podczas infekcji nicieniem. Modelowym układem była kukurydza oraz guzaki arachidowy, z uwagi na znaczenie gospodarcze upraw kukurydzy na świecie oraz rozpowszechnienie zakażeń tym nicieniem. Ponadto, kukurydza jest także dobrze poznanym modelem badawczym, o poznanej genetyce i szerokim warsztacie metod. W swojej pracy Doktorantka sformułowała szereg dobrze przemyślanych i ciekawych hipotez badawczych dotyczących znaczenia wczesnych etapów infekcji kukurydzy przez nicienia dla dalszych etapów rozwoju pasożyta w organizmie roślinnym, szczególnie na poziomie molekularnym, a mianowicie zmian w ekspresji kluczowych genów regulatorowych i efektorowych. Hipotezy dotyczyły także białek wytwarzanych i wydzielanych przez *M. arenaria* w celu przełamania obrony gospodarza. W celu zweryfikowania tych hipotez zostały sformułowane cele szczegółowe rozprawy, gdzie między innymi zaplanowano zbadanie poziomu ekspresji genów odmian kukurydzy charakteryzujących się różną wrażliwością na nicienia podczas infekcji, charakterystykę białek efektorowych *M. arenaria* związanych z infekcją rośliny, analizę oddziaływania tych białek z celami komórkowymi u kukurydzy. Wszystkie cele, zarówno ogólny, jak i szczegółowe, zostały osiągnięte zadowalająco w rozprawie. W skład rozprawy wchodzi bardzo aktualne publikacje, z lat 2018-2023, co świadczy o ich znaczeniu i wpływie na dziedzinę wiedzy.

Ciekawą pozycją wśród tych prac jest publikacja przeglądowa (dwuautorska), która ukazała się w *Plant and Soil* w 2020 roku. Praca ta w interesujący sposób przedstawia i podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat odpowiedzi obronnej roślin podczas infekcji różnymi gatunkami nicieni z rodzaju *Meloidogyne*. Przedstawione i porównane zostały szlaki uruchamiane podczas infekcji u roślin jedno- i dwuliściennych, a także uwagę poświęcono białkom efektorowym guzaków, wykorzystywanych przez nicienie do zwiększania szansy na skuteczną infekcję roślin. Publikacja ta stanowi ciekawe i pomocne wprowadzenie w tematykę

dalszych, eksperymentalnych prac zawartych w rozprawie, przedstawia także istotność badań nad interakcjami patogen-gospodarz na modelu nicień-roślina. W kolejnej publikacji, która ukazała się w *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2018) przedstawiona została analiza zmian w ekspresji genów kukurydzy podczas infekcji guzakiem arachidowym. Podstawę tych badań stanowiły wyselekcjonowane w tej pracy odmiany kukurydzy o różnym stopniu wrażliwości na *M. arenaria*. Badania prowadzono *in planta*, a próby pobierane w punktach czasowych po infekcji były analizowane z wykorzystaniem metody RT-PCR. Najistotniejszym wnioskiem wynikającym z tej pracy jest zaobserwowanie różnic w ekspresji genów związanych z odpowiedzią na atak patogenu (z grupy PR) zarówno w czasie po infekcji, jak i w związku z daną odmianą kukurydzy o różnej wrażliwości na nicienia. Wykazano także istotną rolę szlaków sygnałowych związanych z kwasem jasmonowym i salicylowym na wczesnym etapie infekcji – u roślin wrażliwych szlaki te były istotnie hamowane. Kolejna praca w cyklu, opublikowana w *Molecular Biology Reports* w 2021 roku, przedstawiała charakterystykę zmian w ekspresji specyficznych genów kukurydzy – kodujących czynniki transkrypcyjne, oraz związanych z modyfikacjami ściany komórkowej roślin. Badania te były bardzo ważne, gdyż jak wiadomo z doniesień dotyczących innych gospodarzy roślinnych, nicień jest w stanie na poziomie molekularnym przeprogramować ekspresję istotnych genów roślinnych. Zmiany te (m. in. powstawania w korzeniach roślin komórek olbrzymich) mają ułatwiać pasożytowi przeprowadzenie swojego cyklu rozwojowego w komórkach roślinnych. Do badań wybrano na podstawie wcześniejszych danych geny kodujące regulatory transkrypcji EF1a i EF1b i WRKY53 oraz białka związane ze zmianami w ścianie komórkowej – bogate w glicynę białko wiążące RNA (GRP) i poligalakturonazę. Tu nasuwa się pytanie – **czy taki arbitralny wybór genów na podstawie danych pochodzących z innych roślin i innych stresów nie ograniczył możliwości odkrycia innych szlaków, na które wpływa i modyfikuje infekcja przez guzaka arachidowego?** Ważnym wynikiem uzyskanym w tej pracy jest stwierdzenie zmian w ekspresji genu EF1b w zależności od czasu po infekcji w różnych częściach roślin, zmiany te zależały także od wrażliwości kukurydzy na guzaka. Ponadto, zauważono zmianę w ekspresji genu kodującego białko GRP, związanego z modyfikacją ściany komórkowej w odpowiedzi na różnego rodzaju stresy, co wskazuje na udział tego białka i odpowiednich szlaków w obronie przed infekcją. Ważną częścią badań były poszukiwania białka efektorowego nicienia (publikacja 4, *Plant and Soil*, 2023). Białko takie jest bardzo ważnym elementem efektywnej infekcji przez nicienia i jego szczegółowa charakterystyka może stanowić podstawę do opracowania strategii zapobiegania zakażeniom tym patogenem. Analiza podobieństwa potencjalnych efektorów u innego przedstawiciela rodzaju *Meloidogyne*

wskazała na potencjalne białko MaMsp4. Zbadanie ekspresji tego białka w różnych stadiach rozwojowych nicienia wykazało najwyższy poziom w stadium inwazyjnym J2. Bardzo istotnym wynikiem zaprezentowanym w tej pracy było określenie partnerów białkowych z strony kukurydzy, z którymi białko efektorowe nicienia może oddziaływać. Metodami immunochemicznymi jak i mikroskopowymi wskazano na białka związane z modyfikacjami ściany komórkowej rośliny jak i uczestniczące w jej mechanizmach obronnych, co określa drogi oddziaływania patogenu na gospodarza – osłabianie jego systemów obronnych i zmianę kształtu i organizacji komórki w celu wytworzenia przestrzeni do rozwoju nicienia.

Podsumowując, wyniki przedstawione w rozprawie stanowią bardzo cenny wkład w poznanie molekularnych mechanizmów obronnych roślin przed patogenami. Warte podkreślenia jest także to, że badania prowadzone w ramach doktoratu były finansowane m.in. przez projekt NCN, którego Pani Przybylska była kierownikiem – uzyskanie własnego finansowania badań jest bardzo cenną umiejętnością w obecnym naukowym świecie.

Do uzyskania wyników przedstawionych w rozprawie zastosowano szereg interesujących i zaawansowanych metod zarówno doświadczeń *in planta* w czasie infekcji nicieniem, metod molekularnych pomiaru ekspresji genów (RT-PCR wraz z analizą statystyczną), drożdżowy system dwuhybrydowy, nadekspresji genów w komórkach tytoniu z wykorzystaniem pośrednika bakteryjnego, immunoprecypitację, analizę komórkowej lokalizacji białek metodami mikroskopowymi. Ten bogaty zestaw metod sprawia, że wyniki przedstawione w rozprawie mają wysoką wartość naukową.

W rozprawie zwraca uwagę bardzo dobrze przygotowane wprowadzenie oraz opis wyników, gdzie przystępnie i interesująco przedstawiono zarówno model badawczy, jak i istotność prowadzonych badań, sformułowane zostały hipotezy i cele badawcze, opisane zostały metody oraz wyniki prezentowane w poszczególnych publikacjach. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki i wskazuje na jedną ciekawą linię badawczą, jakiej podporządkowane są prace składające się na rozprawę.

Tak jak wspomniałam wcześniej przy ocenie formalnej rozprawy, preprint z BioRxiv nie mógł zostać wzięty pod uwagę z przyczyn ustawowych, niemniej jednak przeczytałam go z zainteresowaniem, jako że uzupełniał wiedzę na temat mechanizmów obronnych kukurydzy. Chciałabym wyrazić nadzieję, iż praca ta zostanie wkrótce opublikowana w czasopiśmie typu peer-review. I również, jak już wcześniej napisałam, ograniczenie się do oceny 4 prac przedstawionych w rozprawie nie zmniejsza wartości naukowej pracy doktorskiej mgr inż. Arniki Przybylskiej.

Chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź podczas obrony na następujące pytania, jakie nasunęły się podczas czytania rozprawy:

- Jakie są genetyczne lub biochemiczne podstawy specjalizacji w wyborze gospodarza u nicieni?
- Czy można realnie ocenić u nicienia szybkość mutacji, które mogłyby przystosować go do omijania systemów obronnych atakowanej rośliny? Czy istnieje molekularny „wyścig zbrojeń” na poziomie roślina-nicień?
- Czy infekcje nicieniami, jako czynnik stresowy, mogą prowadzić do wzrostu poziomu nietypowego nukleotydu, ppGpp, w komórkach roślin?
- Jaka jest podstawa wyboru określonych genów referencyjnych dla badań zmian w ekspresji genów u kukurydzy?
- Czym różnią się odmiany kukurydzy odporne i wrażliwe na nicienia, poza samym procesem infekcji, czy mają podobne tempo wzrostu, a co za tym idzie, czy można by wprowadzić do upraw na dużą skalę właśnie te odmiany?

Podsumowując tę recenzję stwierdzam, że przedstawiona **rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne stawiane Kandydatom do stopnia doktora**, zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. **Rozprawa stanowi znaczące osiągnięcie naukowe**, poszerzające wiedzę na temat interakcji między patogenem a gospodarzem, a w szczególności przynoszącą istotną wiedzę o funkcjonowaniu mechanizmów obronnych przed nicieniami u kukurydzy. Badania te są istotne zarówno dla wiedzy podstawowej jak i aplikacyjnej, co wskazuje na ich wysoką wartość. Rozprawa została wykonana z zastosowaniem najnowszych metod biologii molekularnej, a jej wyniki zostały zaprezentowane w ostatnich latach w liczących się czasopismach z dziedziny. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o **dopuszczenie Pani mgr inż. Arniki Przybylskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Z uwagi na wysokie znaczenie naukowe prezentowanej rozprawy, wnoszę również o **nagrodzenie jej stosownym wyróżnieniem**.

A. Szelenko - Peter